

**Untersuchungen über die fibrinolytische Aktivität des
Plasmas gesunder Versuchspersonen mit
einer Modifikation der Standardpapierfibrinolyse**

Bernhard Weber

1976

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

Untersuchungen über die fibrinolytische Aktivität des
Plasmas gesunder Versuchspersonen mit einer
Modifikation der Standardpapierfibrinolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard W e b e r
aus
Mittenwald

München 1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Goossens

Mitberichterstatter: Professor Dr. N. Zöllner

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 1976



Mein Gedanke an die Zukunft ist mit der
Erkenntnis des Todes und ganz besonders der Un-
gewissheit der Zukunft und der Unklarheit der Zukunft
verknüpft.

Meinen Eltern gewidmet

Herrn Professor Dr. N. Goossens danke ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die wertvollen Anregungen und Ratschläge zur Gestaltung dieser Arbeit.

1. Einführung in die Wirtschaftsinformatik	1
1.1 Aufgaben der Wirtschaftsinformatik	1
1.2 Entwicklung der Wirtschaftsinformatik	2
1.3 Aufgaben der Wirtschaftsinformatik	3
1.4 Wirtschaftsinformatik als Disziplin	4
1.5 Wirtschaftsinformatik als Fach	5
1.6 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	6
1.7 Wirtschaftsinformatik als Beruf	7
1.8 Wirtschaftsinformatik als Kunst	8
1.9 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	9
1.10 Wirtschaftsinformatik als Religion	10
1.11 Wirtschaftsinformatik als Politik	11
1.12 Wirtschaftsinformatik als Sport	12
1.13 Wirtschaftsinformatik als Spiel	13
1.14 Wirtschaftsinformatik als Kunstwerk	14
1.15 Wirtschaftsinformatik als Lebensform	15
1.16 Wirtschaftsinformatik als Weltanschauung	16
1.17 Wirtschaftsinformatik als Ideologie	17
1.18 Wirtschaftsinformatik als Religion	18
1.19 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	19
1.20 Wirtschaftsinformatik als Kunst	20
1.21 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	21
1.22 Wirtschaftsinformatik als Beruf	22
1.23 Wirtschaftsinformatik als Kunst	23
1.24 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	24
1.25 Wirtschaftsinformatik als Religion	25
1.26 Wirtschaftsinformatik als Politik	26
1.27 Wirtschaftsinformatik als Sport	27
1.28 Wirtschaftsinformatik als Spiel	28
1.29 Wirtschaftsinformatik als Kunstwerk	29
1.30 Wirtschaftsinformatik als Lebensform	30
1.31 Wirtschaftsinformatik als Weltanschauung	31
1.32 Wirtschaftsinformatik als Ideologie	32
1.33 Wirtschaftsinformatik als Religion	33
1.34 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	34
1.35 Wirtschaftsinformatik als Kunst	35
1.36 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	36
1.37 Wirtschaftsinformatik als Beruf	37
1.38 Wirtschaftsinformatik als Kunst	38
1.39 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	39
1.40 Wirtschaftsinformatik als Religion	40
1.41 Wirtschaftsinformatik als Politik	41
1.42 Wirtschaftsinformatik als Sport	42
1.43 Wirtschaftsinformatik als Spiel	43
1.44 Wirtschaftsinformatik als Kunstwerk	44
1.45 Wirtschaftsinformatik als Lebensform	45
1.46 Wirtschaftsinformatik als Weltanschauung	46
1.47 Wirtschaftsinformatik als Ideologie	47
1.48 Wirtschaftsinformatik als Religion	48
1.49 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	49
1.50 Wirtschaftsinformatik als Kunst	50
1.51 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	51
1.52 Wirtschaftsinformatik als Beruf	52
1.53 Wirtschaftsinformatik als Kunst	53
1.54 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	54
1.55 Wirtschaftsinformatik als Religion	55
1.56 Wirtschaftsinformatik als Politik	56
1.57 Wirtschaftsinformatik als Sport	57
1.58 Wirtschaftsinformatik als Spiel	58
1.59 Wirtschaftsinformatik als Kunstwerk	59
1.60 Wirtschaftsinformatik als Lebensform	60
1.61 Wirtschaftsinformatik als Weltanschauung	61
1.62 Wirtschaftsinformatik als Ideologie	62
1.63 Wirtschaftsinformatik als Religion	63
1.64 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	64
1.65 Wirtschaftsinformatik als Kunst	65
1.66 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	66
1.67 Wirtschaftsinformatik als Beruf	67
1.68 Wirtschaftsinformatik als Kunst	68
1.69 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	69
1.70 Wirtschaftsinformatik als Religion	70
1.71 Wirtschaftsinformatik als Politik	71
1.72 Wirtschaftsinformatik als Sport	72
1.73 Wirtschaftsinformatik als Spiel	73
1.74 Wirtschaftsinformatik als Kunstwerk	74
1.75 Wirtschaftsinformatik als Lebensform	75
1.76 Wirtschaftsinformatik als Weltanschauung	76
1.77 Wirtschaftsinformatik als Ideologie	77
1.78 Wirtschaftsinformatik als Religion	78
1.79 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	79
1.80 Wirtschaftsinformatik als Kunst	80
1.81 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	81
1.82 Wirtschaftsinformatik als Beruf	82
1.83 Wirtschaftsinformatik als Kunst	83
1.84 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	84
1.85 Wirtschaftsinformatik als Religion	85
1.86 Wirtschaftsinformatik als Politik	86
1.87 Wirtschaftsinformatik als Sport	87
1.88 Wirtschaftsinformatik als Spiel	88
1.89 Wirtschaftsinformatik als Kunstwerk	89
1.90 Wirtschaftsinformatik als Lebensform	90
1.91 Wirtschaftsinformatik als Weltanschauung	91
1.92 Wirtschaftsinformatik als Ideologie	92
1.93 Wirtschaftsinformatik als Religion	93
1.94 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	94
1.95 Wirtschaftsinformatik als Kunst	95
1.96 Wirtschaftsinformatik als Wissenschaft	96
1.97 Wirtschaftsinformatik als Beruf	97
1.98 Wirtschaftsinformatik als Kunst	98
1.99 Wirtschaftsinformatik als Philosophie	99
1.100 Wirtschaftsinformatik als Religion	100

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeiner Teil

1. Einleitung	... 1
2. Definition und Wirkungsmechanismus der Fibrinolyse	... 3
3. Aktivatoren der Fibrinolyse	... 5
4. Inhibitoren der Fibrinolyse	... 7
5. Spontanfibrinolyse	... 7
6. Nachweismethoden	... 9
6.1 Fibrinplattenmethode	... 9
6.2 Euglobulinlyse-Test	... 9
6.3 Thrombelastographie	... 10
6.4 Clotlysistime	... 11

II. Experimenteller Teil

1. Verwendete Materialien und Geräte	... 13
2. Prinzip der Methode	... 14
3. Versuchsdurchführung	... 14
3.1 Testansatz und Inkubation	
3.2 Wässerung, Färbung, Entfärbung und Trocknung	... 15
3.3 Photometrische Auswertung	... 17
3.4 Berechnung der Lyse	... 17
3.5 Statistische Auswertung	... 19
4. Versuchsablauf und Versuchsbedingungen	... 21
5. Ergebnisse	... 23
5.1 Verbesserungen im technischen Ablauf der Methode	
5.2 Versuche zur Bestimmung der Fehlerbreite der Methode	... 24
5.3 Physiologische Schwankungsbreite der fibrinolytischen Aktivität	... 27
5.4 Vergleich der Lyse von Frischplasma und Gefrierplasma	... 29

5.5 Vergleich der Extinktionswerte unge-	
stoppter und gestoppter Plasmen	... 33
5.6 Fehlerquellen	... 37
6. Diskussion	... 38
6.1 Zur Methode	
6.2 Physiologische Schwankungsbreite der	
Normextinktion (Norm E)	... 40
6.3 Gefrierplasma	... 40
6.4 Bestimmung der Norm E (= O%-Lyse)	... 42
7. Zusammenfassung	... 43
Literaturverzeichnis	... 45
Lebenslauf	... 51

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung

Auf die Geschichte der Lyseforschung soll nicht näher eingegangen werden, sondern nur die wichtige Entdeckung des amerikanischen Klinikers Tillet aus dem Jahre 1935 erwähnt werden, daß Filtrate gewisser hämolytischer Streptokokken menschliche Plasmagerinnsel auflösen können (64).

Diese Erkenntnis war ein Markstein in der Geschichte der Lyseforschung, denn von nun an konnte der fibrinolytische Vorgang ausgelöst und in seinen Einzelheiten studiert werden.

Christensen entdeckte 1945, daß die lytische Aktivität, ausgelöst durch Streptokinase, auf Plasminogenaktivierung beruht (15).

Das sog. fibrinolytische System wurde in den letzten 20 Jahren genauer untersucht und der Mechanismus des Fibrinolysevorgangs weitgehend geklärt.

Die Bedeutung der Lyseforschung hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dies gilt nicht nur für Fragen der Diagnostik, also der Meßmethoden und klinischen Untersuchungsmethoden, sondern besonders auch für die therapeutischen Ansätze, um z.B. durch Aktivierung der lytischen Fähigkeit des Blutes die Auflösung von Gerinnseln im Körper zu fördern.

Gerade für letzteren Zweck hat sich die Anwendung von Mitteln bewährt, welche das plasmaeigene Plasminogen zu Plasmin aktivieren und damit aktives fibrinolytisches Ferment im Körper hervorrufen.

Hierzu eignet sich in hervorragendem Maße Streptokinase (SK). Die SK ist ein Antigen und führt zur Bildung von Antistreptokinase im Organismus, die bei vielen Menschen mit vorhergegangenen Streptokokkeninfektionen in mehr oder weniger hohem Titer bereits vorhanden sein kann.

Vor jeder SK-Anwendung ist es daher notwendig, den Antistreptokinasetiter zu bestimmen, um zu wissen, wieviel SK

gegeben werden muß, um eine ausreichende lytische Aktivität hervorzurufen.

Diese wiederum sollte während einer Lysetherapie laufend kontrolliert werden, um das therapeutisch notwendige Niveau einhalten zu können. Einerseits, um nicht zu wenig zu geben, also evtl. erfolglos zu sein, andererseits um nicht in Unverträglichkeits- und Nebenwirkungen hineinzugeraten. Abgesehen davon spielen auch noch ökonomische Gesichtspunkte eine Rolle, weil die SK vorläufig immer noch recht kostspielig ist.

Sowohl das Blutgerinnungssystem als auch das fibrinolytische System befinden sich im gesunden Organismus in einem, man könnte sagen, dynamischen Gleichgewicht, auf das wir später noch eingehen werden.

Wird dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu Blutungen oder thrombo-embolischen Ereignissen kommen. Bei pathologischen Veränderungen des fibrinolytischen Systems kann vermehrte Fibrinolyse (Hyperfibrinolyse) oder ihr Gegenteil auftreten, so daß auch Mikrothromben nicht lysiert werden und es zu mehr oder weniger großen Störungen der Blutzirkulation kommt.

Antikoagulantien verhindern Thrombusbildung, Fibrinolytika lösen bereits gebildete, nicht organisierte Thromben und Emboli auf.

Die Antikoagulantientherapie muß nach jeder Fibrinolysetherapie angeschlossen werden, da die Lysetherapie als solche keine antikoagulierende Dauerwirkung hat, also keinen Schutz vor Rethrombosierung bietet.

Für die Kontrolle der Antikoagulantientherapie stehen verschiedene Methoden (Thrombinzeit, Rekalzifizierungszeit usw.) zur Verfügung (33).

Vergleichbar einfache und schnell zu handhabende, quantitative Methoden zur Messung der fibrinolytischen Aktivität gibt es bisher nicht.

Wir haben uns deswegen in dieser Arbeit darum bemüht, die zur Zeit quantitativ wohl am besten arbeitende Methode,

die standardisierte Fibrinolysebestimmung nach N. Goossens (25), die allerdings heute noch ziemlich zeitaufwendig ist, in technischer Hinsicht zu verbessern, und an Hand vergleichender Messungen einige offene Fragen der Lysebestimmung zu beantworten.

2. Definition und Wirkungsmechanismus der Fibrinolyse

Unter Fibrinolyse versteht man die enzymatische Auflösung von Fibrin, das bei der Blutgerinnung z.B. im Rahmen einer Blutstillung, bei der Wundheilung und bei entzündlichen Prozessen ausgefällt worden ist.

Die fibrinolytische Aktivität, im Folgenden kurz als Lyse bezeichnet, ist an ein proteolytisches Ferment gebunden, das Plasmin, welches im Blut als inaktives Proenzym Plasminogen vorliegt und durch Kinasen bzw. Aktivatoren, die sowohl im Blut als auch im Gewebe vorkommen, zu Plasmin aktiviert wird.

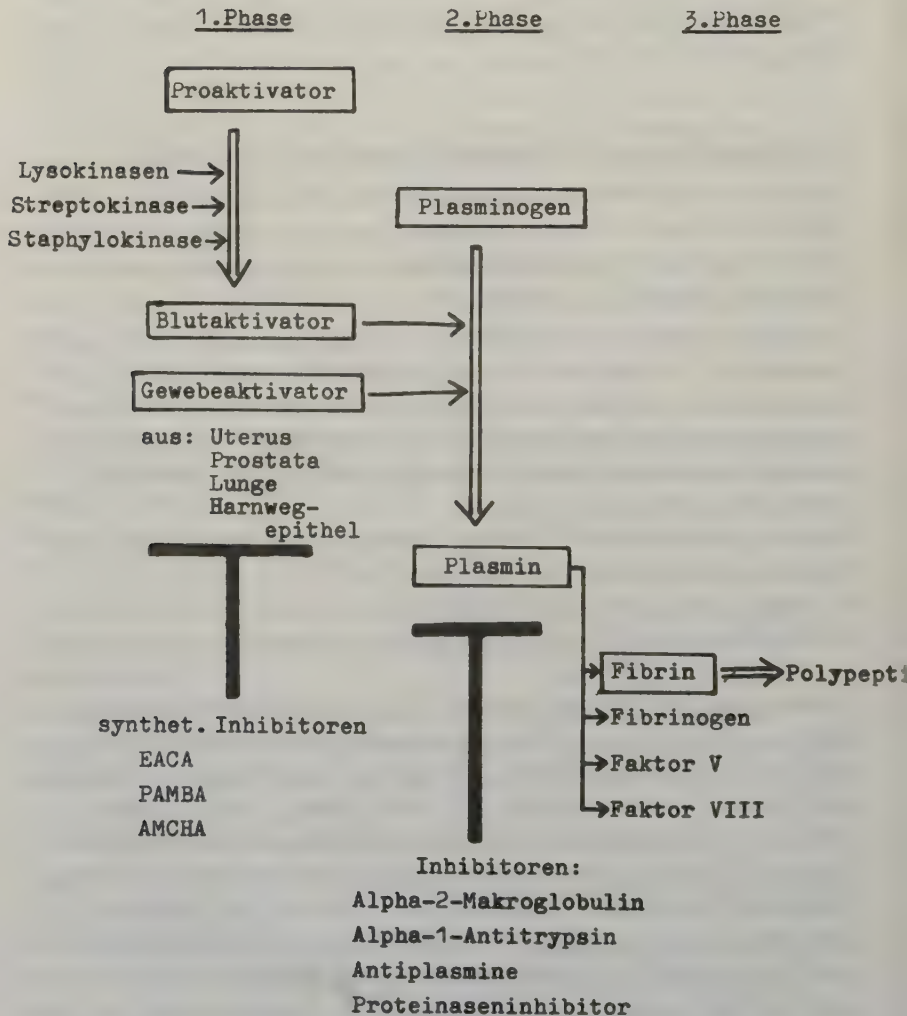
Ähnlich wie die Blutgerinnung kann man auch die Fibrinolyse in 3 Abschnitte unterteilen (Abb.1):

- a) Die Bildung von Aktivatorsubstanz
- b) Die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin
- c) Die Fibrinspaltung

Plasmin spaltet Fibrin proteolytisch in Polypeptidbruchstücke, die wiederum einen gerinnungshemmenden Effekt als sog. Polymerisationshemmer entfalten. Plasmin ist in der Lage, auch andere Plasmaproteine wie Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII zu spalten, ist also nicht substratspezifisch. Trotzdem besteht eine gewisse Spezifität insofern, als die Vorstufe Plasminogen in selektiver Weise an das Fibrin adsorbiert wird (32,35). Dadurch kann Plasmin nach erfolgter Aktivierung viel unmittelbarer auf Fibrin einwirken als auf die anderen Plasmaproteine.

Von klinischer Bedeutung ist ferner, daß durch Aktivierung der Fibrinolyse eine Störung des Gerinnungssystems im Sinne der Induzierung einer vermehrten Gerinnbarkeit möglich ist (31).

Abb. 1: Fibrinolyseschema zitiert nach Jaenecke (32)



3. Aktivatoren der Fibrinolyse

Die Aktivatorbildung ist ein noch nicht in allen Punkten geklärter Prozeß.

Aktivator kann z.B. aus geschädigten oder zerstörten Gewebezellen freigesetzt werden und je nach Aktivatorgehalt des Gewebes zu fibrinolytisch bedingten Blutungen führen, indem er eine direkte Umwandlung von Plasminogen in Plasmin bewirkt. Die quantitative Bestimmung dieser Gewebeaktivatoren gelang Astrup und Albrechtsen (6), wonach Uterus (Myometrium), Nebennieren, Lymphdrüsen, Prostata und Schilddrüse den höchsten Aktivatorgehalt haben, die Leber hingegen nahezu aktivatorfrei ist, ebenso wie die Intima der Aorta (1,64).

Auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten sind Aktivatoren nachweisbar, wie z.B. in der Tränenflüssigkeit (58), Frauenmilch (8), Speichel (2) und im Urin (9).

Der aus dem Urin gewonnene Aktivator wird auch als Urokinase bezeichnet. Diese wird wahrscheinlich von den Nierenepithelien produziert (46), wie Versuche mit in vitro kultivierten Nierenzellen zeigen. Ihre physiologische Bedeutung scheint in der Freihaltung der ableitenden Harnwege von Fibringerinnseln zu liegen, die auf entzündlicher Basis oder bei Blutungen entstehen können (62).

Durch die fehlende Antigenität und Toxizität der Urokinase ist sie ein wertvolles Mittel bei der Behandlung thromboembolischer Erkrankungen.

Hess und Goossens (30) konnten dies bei Rezidivverschlüssen in Extremitätenarterien demonstrieren, nachdem die erneute Zufuhr von Streptokinase wegen der Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion nicht mehr in Frage kam.

Der breiten klinischen Anwendung der Urokinase stehen vorläufig die sehr hohen Herstellungskosten im Wege.

Die Bildung des Blutaktivators ist möglicherweise eine vorangegangene Reaktion eines Proaktivators mit den sog. Lyso-kinasen, die aus Leukozyten freigesetzt werden können.

Es ist aber auch denkbar, daß die Lysokinasen direkt mit Plasminogen reagieren und damit eine Aktivierung zu Plasmin möglich ist (31).

Ein ähnlicher Wirkungsmechanismus wird auch für die Streptokinase vermutet, die von allen therapeutisch-fibrinolytischen Prinzipien bisher die größte klinische Bedeutung als Aktivator erlangt hat. Bei der SK handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt β -hämolytischer Streptokokken mit antigener Wirkung. Auf die Bedeutung der Bestimmung des Antistreptokinasetiters vor Beginn einer fibrinolytischen Behandlung wurde bereits in der Einleitung hingewiesen.

Die SK führt letzten Endes dazu, daß ein Aktivator oder ein Aktivatorkomplex im Blut vorhanden ist, der Plasminogen in Plasmin umwandelt. Folgende 4 Möglichkeiten über die Entstehung dieses Aktivatorkomplexes werden diskutiert (31):

1. unveränderte Streptokinase ist ein Aktivator,
2. Streptokinase + Plasmin bilden den Aktivator,
3. Streptokinase + Plasminogen bilden den Aktivator,
4. Streptokinase + Proaktivator bilden den Aktivator.

Weitere, Fibrinolyse induzierende Substanzen sind Aspergillin, gewonnen aus *Aspergillus oryzae*. Umfangreichere klinische Erfahrungen mit dieser Substanz fehlen noch.

Die früher diskutierte fibrinolytische Wirkung von Nikotinsäurederivaten und einigen Heparinoiden hat wegen ihrer kurzfristigen und ungenügenden Wirkung keine große klinische Bedeutung erlangt.

In hohen Konzentrationen - oft an der Grenze der Verträglichkeit - sind eine Reihe von Substanzen in der Lage, Fibrinolyse zu aktivieren (31).

4. Inhibitoren der Fibrinolyse

Ähnlich wie das Gerinnungssystem wird auch das fibrinolytische System durch Inhibitoren im Gleichgewicht gehalten. Sie hemmen entweder im Blut vorhandenes Plasmin (Antiplasmin) oder den Aktivator (Antiaktivatoren) (5, 38, 52).

Die Antiplasmin im Blut unterteilen Schwick und Heimbürger nach ihrer Reaktionsgeschwindigkeit in einen Progressivinhibitor und in Antiplasmin vom Soforttyp.

Der Progressivinhibitor, ein Alpha-1-Antitrypsin (Globulin), hemmt Plasmin irreversibel (51). Sofortantiplasmin sind Alpha-2-Makroglobuline, die mit Plasmin einen leicht dissoziablen Komplex bilden (3, 4). Bei Berührung mit Fibrin lagert sich Plasmin an Fibrin und spaltet es auf.

Ein Hinweis darauf, daß möglicherweise in einzelnen Organen antiproteolytisch wirksame Substanzen produziert werden, ist der Kallikreininhibitor, wobei noch nicht klar ist, ob derartige Inhibitoren nur lokal wirksam sind oder auch im Gesamtkreislauf Bedeutung gewinnen können (31).

Von den pflanzlichen Inhibitoren sind die in Sojabohnen (36), Kichererbsen, Erdnüssen (12) und Kartoffeln gefundenen Antiplasmin zu erwähnen.

Therapeutisches Interesse haben synthetische Fibrinolyse-inhibitoren erlangt, wie:

Epsilon-Aminocapronsäure (EACA)

P-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA) und

4-Aminomethyl-cyclohexancarbonsäure (AMCHA).

Diese Substanzen entfalten ihre antifibrinolytische Wirkung überwiegend durch Hemmung der Plasminogenaktivierung (42).

5. Spontanfibrinolyse

Im gesunden Organismus stehen Blutgerinnung und Fibrinolyse in einem dynamischen Gleichgewicht.

An der intakten Gefäßwand wird dauernd Fibrin in kleinsten Mengen gebildet (latente Gerinnung) und durch die gleichfalls

latente Fibrinolyse wieder aufgelöst, so daß das hämostatische Gleichgewicht erhalten bleiben kann.

Unter lytischer Spontanaktivität versteht man die Konzentration an freiem Plasmin, die in Gegenwart der Inhibitoren zur Wirkung kommt (29).

Eine Verringerung der lytischen Aktivität wurde nach massiver Zufuhr von Nahrungsstoffen (Eier, Milch, Fette) festgestellt (13, 20, 37, 44, 45).

Die sog. normale fibrinolytische Aktivität kann durch zahlreiche Umstände gesteigert werden: Morgens (13), bei schwerer körperlicher Anstrengung (41), bei emotionellen Belastungen, durch Pyrogeneinwirkung und bei Elektroschock (18), also bei Streßzuständen. Hierbei kommt es zur Auflösung von ausgefälltem Fibrin (das stets Plasminogen adsorbiert enthält), doch besteht in der Regel keine Blutungsgefahr.

Diese "physiologische" Aktivierung des fibrinolytischen Systems reicht offenbar nicht aus, die Inhibitoren des Plasmas soweit zu neutralisieren, daß eine Blutungsgefahr entstehen könnte.

Die fibrinolytische Aktivität kann jedoch durch bestimmte pathologische Bedingungen gesteigert werden. Dabei können lebensbedrohliche hämorrhagische Diathesen auftreten, die durch eine hochgradige Steigerung der Fibrinolyse (sog. Hyperfibrinolyse) und starke Abnahme des Fibrinogens durch Auftreten von Fibrinspaltprodukten, die gerinnungshemmend wirken, charakterisiert werden, z.B. beim Prostatacarcinom (59) und bei gewissen geburtshilflichen Komplikationen (47), z.B. bei der vorzeitigen Lösung der Plazenta (61) ohne Einschwemmung thromboplastischen Materials in die Blutbahn. Eine gesteigerte Fibrinolyse wurde weiterhin beobachtet bei Leberzirrhose (21), akuten Leukämien (52) und Polycythämia vera (11).

6. Nachweismethoden

Bei der Behandlung akuter Thrombosen, Embolien und Infarkten mit fibrinolytisch wirkenden Präparaten und bei der Überwachung dieser Therapie gewinnen Nachweismethoden für Plasmin und für das gesamte fibrinolytische Potential (Plasminogen und Proaktivator) zunehmende Bedeutung. Aus der Vielzahl der beschriebenen Methoden ist zu erkennen, wie schwierig es ist, quantitative Aussagen über die tatsächlich vorhandene fibrinolytische Aktivität einer Testflüssigkeit zu erhalten. Es werden hier nur einige, in der Klinik häufig angewandte Methoden aufgeführt.

6.1 Fibrinplattenmethode nach Astrup und Müllertz (7)

Prinzip: Rinderfibrin-Agarplatten werden mit der zu untersuchenden Testlösung (Serum oder Plasma) beschickt. Die um den Testtropfen entstehende aufgehellte runde Zone (sog. Lysehof) ist ein Maß für die fibrinolytische Aktivität.

Die Methode stellt technisch hohe Anforderungen und ermöglicht nur halbquantitative Ergebnisse.

Durch Erhitzen der Fibrinplatten während 30-45 Minuten auf 80°C (39) wird etwa vorhandenes Plasminogen inaktiviert.

Mit diesen Platten kann also die reine Plasminwirkung einer Testflüssigkeit bestimmt werden.

Bei der Erhitzung der Platten kommt es aber auch zu einer gewissen Denaturierung des Fibrins, so daß die Empfindlichkeit der Methode geringer ist (57). Die Lysehöfe sind nicht mehr so klar abgegrenzt.

6.2 Euglobulinlyse-Test (Modifikation nach von Kaulla (34))

Prinzip: Citratplasma wird mit Kohlendioxyd durchblasen.

Durch den so erreichten pH-Wert von 5,2 - 5,3 werden die Euglobuline (sie enthalten sämtliche Gerinnungs- und Lysefaktoren) ausgefällt, während die Albumine (sie enthalten die am stärksten

wirksamen Antiplasminen) in Lösung bleiben. Durch Zentrifugieren erhält man die Euglobuline im Sediment, das dann in gepufferter Kochsalzlösung aufgelöst wird. Diese Euglobulinlösung wird mit Thrombin versetzt und zur Gerinnung gebracht. Gemessen wird die Zeit vom Gerinnungseintritt bis zur vollständigen Auflösung des Eigenfibringerinnsels. Man bestimmt vorwiegend die Wirkung des Plasmins ohne Hemmung durch die Albumin-Antiplasminen.

Die Euglobulinfibrinolyse weicht oft erheblich von der Spondanfibrinolyse ab, da nur ein Teil der Inhibitoren ausgeschaltet ist (die Globulinhemmstoffe sind vorhanden). Häufig sind Veränderungen in der Euglobulinfibrinolyse Ausdruck von Schwankungen der Antiplasminaktivität bei gleichbleibendem Plasmin. Die klinische Interpretation muß daher mit Vorsicht erfolgen (57). Die erhaltene Lysezeit schwankt von Labor zu Labor erheblich (5 - 24 Stunden) und die Werte sind nur mit dem eigenen Laborstandard zu vergleichen.

6.3 Thrombelastographie nach Hartert (28)

Prinzip: Mit dem Thrombelastographen kann der Gerinnungsablauf photokymographisch registriert werden, einschließlich der Phase der Fibrinolyse. Gemessen wird sowohl die Gerinnungsgeschwindigkeit als auch laufend die Scherelastizität des entstehenden Fibringerinnsels, bzw. des sich nach der Gerinnung wieder auflösenden Fibrins. Eine mit Blut gefüllte Stahlküvette wird durch einen Synchronmotor regelmäßig hin und her bewegt. Von oben ragt ein torsionselastisch aufgehängter, zylindrischer Stift in die Küvette. Die Zähigkeit der Blutmasse wird durch das ausfallende Fibrin so groß, daß der Torsionswiderstand des Drahtes überwunden wird und der eintauchende Stift bei jeder Drehung mitgenommen wird. Die Ausschläge des Zylinders werden mit Spiegel und

und Lichtquelle auf einem Photopapier registriert. Die vom Thrombelastographen geschriebene Kurve ist der Ausdruck der Konsistenz des Fibringerinnsels.

Die Anschaffung des Gerätes ist sehr kostspielig. Häufig wird das Gerinnsel im Apparat akzidentell verändert (z.B. Abrißphänomen etc.), so daß die Fibrinolyse nicht mehr weiter verfolgt werden kann (50).

6.4 Clotlysistime nach Fearnley (20)

Prinzip: Das Blut wird so stark verdünnt, daß die Hemmstoffe der Fibrinolyse nicht mehr recht zur Wirkung kommen. Durch Verwendung von Phosphatpuffer wird außerdem die Gerinnselstruktur so verändert, daß das Gerinnsel leichter für das fibrinolytische Ferment angreifbar ist. Durch Anwendung einer photographischen Einrichtung ist es möglich, die Lysezeit genau zu bestimmen.

Alle diese Methoden muß man zu den sog. halbquantitativen Meßmethoden rechnen. Darin liegt unter anderem auch die Ursache, daß die von den verschiedenen Laboratorien ermittelten Standardwerte oft erheblich voneinander abweichen. Die Ergebnisse verschiedener Institute oder Kliniken zu vergleichen ist infolgedessen äußerst schwierig.

Auf der Suche nach einer Verbesserung der quantitativen Messung wurde von Goossens und Mitarbeitern (22) eine quantitativ photometrische, standardisierte Papierfibrinolysebestimmung entwickelt. Sie bestimmte anfangs die Lyse des mit SK aktivierten Humanplasmas.

Später (23) diente als Testlösung nicht-aktiviertes Plasma (Spontan-Papierfibrinolyse).

Nach weiterer Vereinfachung und Standardisierung (48, 50, 54, 55, 63) steht heute die sog. Standardfibrinolysemethode zur Verfügung (24, 25). Das Standardfibrinpapier (SFP) wird industriell hergestellt, als Testlösung kann SK-aktiviertes

oder nicht aktiviertes Humanplasma verwendet werden. Es läßt sich also sowohl die spontane als auch die durch Aktivierung erzeugte fibrinolytische Aktivität bestimmen.

Diese Methode arbeitet zwar quantitativer als die bisher gebräuchlichen Methoden, erfordert jedoch einen erheblichen zeitlichen und apparativen Aufwand.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Verwendete Materialien und Geräte

- 1) Natriumcitrat 3,8 %ig, neutral
- 2) Chromatographiepapier MN 260 N^x zur Leerwertbestimmung
- 3) Standard-Fibrinpapier MN 260 N (SFP^x)
- 4) Veronal-HCL- Puffer (0,05 mol.) pH 7,3
- 5) Amidoschwarzlösung 10 B (Merck)
- 6) Elphorentfärber (900 ml Methanol + 100 ml Eisessig)
- 7) 0,1 N Natronlauge (E = 0,044)
- 8) Aqua bidest.
- 9) Veronal-HCL-Puffer (0,05 mol., pH 7,3) versetzt mit
300 E/ml Trasylol
1 mg/ml trans-AMCHA
- 10) Filtrierpapier
- 11) Photometer "Eppendorf" mit Monochromatfilter (Hg 546 nm)
- 12) Normalküvetten (Type B, lichte Breite 10 mm) zum
"Eppendorf"-Photometer
- 13) Brutschrank (37°C)
- 14) Glasschalen "Assistent" Nr. 2911, Größe 1 (12 x 6 x 4 cm)
mit Messingdeckel und Dichtung
- 15) Objektträgerpinzetten
- 16) Papierschneidemaschine
- 17) Reagenzgläser (Länge 9,5 cm, Durchmesser 1,5 cm)
- 18) Plastikröhrchen (für 10 ml) mit Stopfen, sterilisiert
- 19) Schüttelmaschine
- 20) Pumpe (2700 U/min)
- 21) Plastikkanister (20 l Volumen)
- 22) 12 Entfärboxen verbunden mit Plastikschläuchen,
PVC, 10,5 x 5 x 5 cm
- 23) Rückschlagventil (V2A-Stahl)

^x hergestellt von der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren

- 24) Nokken-Zeitschaltwerk
- 25) Magnetventil (2-Weg-Kolbenventil)
- 26) Meßpipetten (1 ml und 25 ml)

2. Prinzip der Methode

Chromatographiepapier wird mit in der Menge und Konzentration definierter Rinderfibrinogenlösung getränkt, die mittels Thrombinlösung in Fibrin umgewandelt wird.

Wir sind von der Selbstherstellung abgekommen, weil u.a. bei der Herstellung kleiner Mengen leicht Chargendifferenzen auftreten. Die Firma Macherey, Nagel & Co. (Düren), die auf Elektrophoresepapier spezialisiert ist, stellt das sog. Standardfibrinpapier (SFP) in größeren Mengen her; es weist eine dünne Fibrinschicht in definierter Menge mit relativ großer Oberfläche auf und ist plasminogenfrei.

Definierte Teile eines solchen SFP werden in der auf fibrinolytische Aktivität zu prüfenden Testlösung (z.B. Citratplasma) inkubiert. Danach erfolgt die Weiterbehandlung etwa analog dem Vorgang bei der Elektrophorese, d.h. nach Färbung mit Amidoschwarz und Entfärbung mit Methanoleisessig wird der Restfibringehalt des SFP quantitativ photometrisch mit der Eluationsmethode bestimmt.

3. Versuchsdurchführung

Die beschriebene Standardpapierfibrinolysebestimmung nach N. Goossens wurde in unserer Untersuchung folgendermaßen durchgeführt.

3.1 Testansatz und Inkubation

Citratblut (1 Teil 3,8 %ige Na-Citrat-Lösung und 4 Teile Venenblut) wird 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wird abgehebert.

Ansatz: 1 ml Citratplasma

6,5 ml Veronal-HCL-Puffer (pH 7,3)

Das Plasma wird mit dem Puffer durch leichtes Schwenken gleichmäßig vermischt.

Das SFP (75 x 39 mm) legt man mit der Pinzette auf die Plas-maverdünnung und verschließt die Glasschale mit dem Deckel. Der SFP-Streifen saugt sich voll und taucht unter. Das SFP wird 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2 Wässerung, Färbung, Entfärbung und Trocknung

Zur Entfernung des überschüssigen Plasmas werden die SFP-Streifen nach der Inkubation 15 Minuten in fließendem Leitungswasser gespült, ebenso die nicht inkubierten Chromatographiepapierstreifen ohne Fibrin (Leerwert).

Hierzu legen wir die Streifen einzeln in die Entfärbeboxen (Abb.2), die über kurze PVC-Schläuche hinter- und nebeneinander geschaltet sind. Nach dem Schließen der Boxen mit einem Deckel, der eine weiche PVC-Platte als Auflagefläche besitzt, wird das Boxensystem an die Wasserleitung angeschlossen.

Zum nun folgenden Färben und Entfärben wird das System an eine Pumpe, die Entfärbeflüssigkeit in die Boxen pumpt und an ein magnetisches Ablaufventil, das zusammen mit der Pumpe über ein Nockenzeitschaltwerk gesteuert wird, angeschlossen. Die Boxen stehen auf einer Schüttelmaschine.

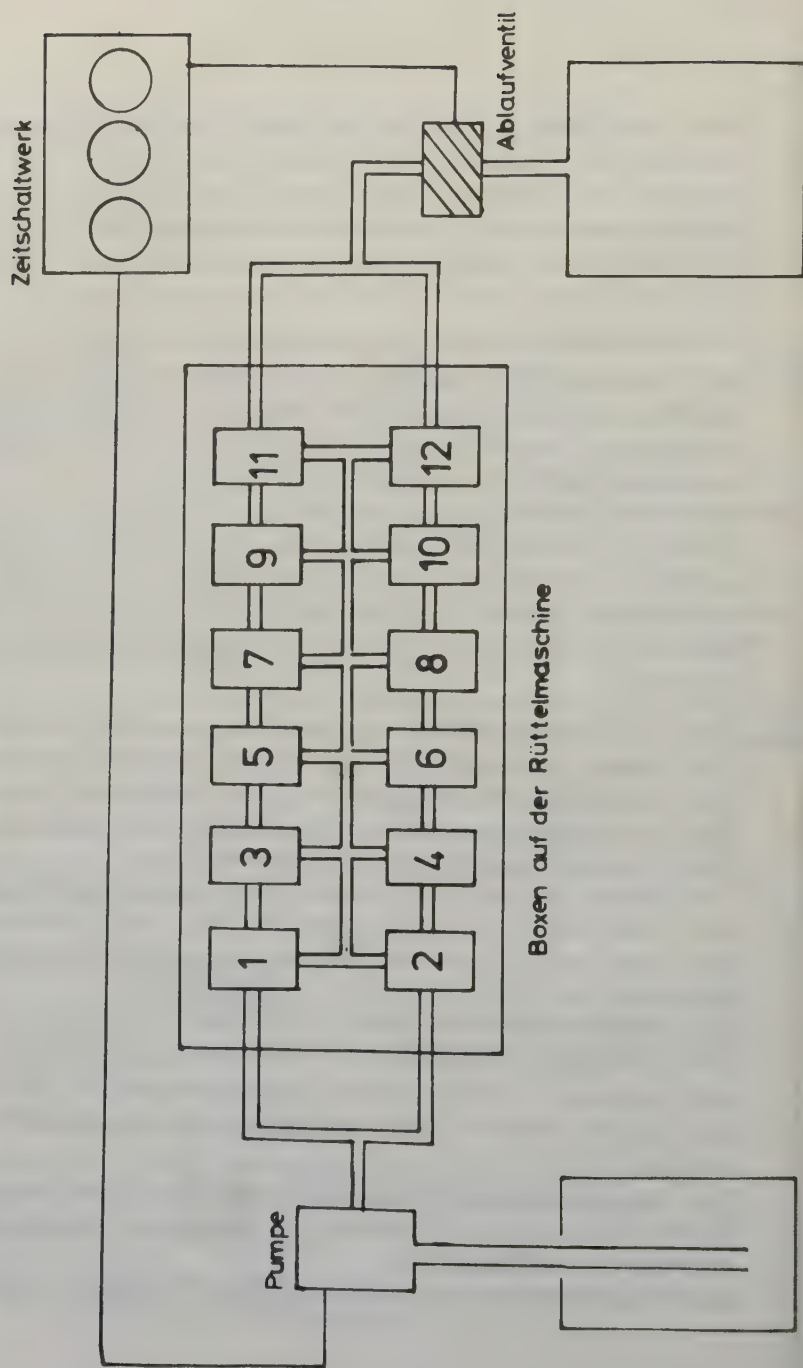
Zur Färbung wird eine definierte Menge Amidoschwarzlösung in die Boxen gefüllt (bis alle Streifen vollständig überschwemmt sind, das sind 500 ml) und die Streifen werden nun unter ständigem Schütteln 10 Minuten lang angefärbt.

Von diesem Zeitpunkt an läuft der gesamte Färbungs- und Entfärbungsvorgang automatisch ab, er wird vom Nockenzeitschaltwerk gesteuert. Dieses besitzt Nockenschalter für die Ein- und Ausschaltung der Pumpe und für die Öffnung und Schließung des Ventils.

Nach dem Ablauf der Färbelösung, sowie nach jeder einzelnen Entfärbephase, wird automatisch 1 Minute lang mit Entfärbeflüssigkeit durchgespült.

Entfärbung erfolgt mit Elphor-Entfärber (Methanol-Eisessig 9:1)

ABB.2: Entfärbeboxen mit Schaltsystem



in mehreren Phasen jeweils 10 Minuten lang. Dies wird so lange wiederholt, bis der Entfärber klar bleibt, d.h. sein Extinktionswert kleiner als 0,05 ist. Der Extinktionswert des unbenützten Entfärbers liegt bei 0,044.

Wir haben diesen Extinktionswert des Entfärbers schon nach 2 Stunden 30 Minuten festgestellt, ließen die Maschine aber zur Sicherheit stets 3 Stunden lang laufen, gerechnet vom 1. Einlauf des Entfärbers an. Die verbrauchte Menge des Entfärbers betrug 15 Liter.

Anschließend erfolgt Trocknung der Papierstreifen bei Raumtemperatur auf Filterpapier als Unterlage.

3.3 Photometrische Auswertung, Eluationsmethode

Die Teststreifen (7,5 x 4,0 cm) werden mit einer Papierschnidemaschine auf ein Format von 5,0 x 3,0 cm zugeschnitten, wobei sämtliche Randbezirke weggесhritten und verworfen werden, weil sie durch das Anfassen mit der Pinzette und die Markierung mit Bleistift evtl. beschädigt sind.

In Glasschalen (12 x 6 x 4 cm) pipettiert man jeweils 25 ml 0,1 N Natronlauge und gibt mit der Pinzette die Teststreifen bzw. die Leerwertstreifen dazu.

Unter ständigem Schütteln der Glasschalen mittels Schüttelmaschine werden die Papierstreifen eluiert. Nach genau 30 Minuten werden die Streifen entnommen und die Extinktion der Farblösung wird in Normalküvetten im "Eppendorf-Photometer" (Monochromatfilter, Hg 546) gemessen.

3.4 Berechnung der Lyse

Die Lysequote LQ ist ein Maß für die fibrinolytische Aktivität der Testflüssigkeit. Sie wird nach folgender Formel in Prozenten errechnet:

$$\text{Lyse \%} = 100 - \frac{\text{Lyse E} - \text{Papier E}}{\text{Norm E} - \text{Papier E}} \times 100$$

Lyse E = Extinktion (E) des in Testplasma inkubierten SFP

Norm E = Extinktion des in Normplasma inkubierten SFP
= 0 % Lyse

Papier E = Extinktion des Chromatographiepapiers ohne Fibrin
= Leerwert, 100 % Lyse.

Eigentlich sollte gefärbtes SFP ohne Plasmainkubation den 0 %-Lysewert darstellen. Wie jedoch aus früheren Versuchen (26, 50, 55) und auch aus unserer Arbeit ersichtlich war, liegen die E-Werte des nicht in Plasma inkubierten SFP bedeutend niedriger als die E-Werte des in Plasma inkubierten SFP (siehe Tabelle 1).

Als Erklärung hierfür ist die vermehrte Farbstoffaufnahme der inkubierten Folien auf Grund der Adsorption von Plasmaproteinen an das Fibrinpapier zu nennen (8), die trotz guter Wässerung bestehen bleibt. Demnach würde sich aus oben genannter Formel eine negative Lysequote ergeben, was zu der falschen Annahme führt, daß das nicht inkubierte SFP bereits eine Lyse aufweist. Als Bezugssystem kann daher nur ein in Plasma inkubiertes SFP verwendet werden.

Es wurde folgende Berechnung festgelegt (25):

Bei Bestimmung der LQ verschiedener Plasmen (ohne zusätzliche Aktivierung) gilt als 0 %-Lysewert der E-Wert eines Mischplasmas von mindestens 3 gesunden Versuchspersonen.

Bei Berechnung der LQ nach Aktivierung des gleichen Plasmas, z.B. durch Zusatz von Streptokinase oder während einer therapeutischen Lyse, dient der E-Wert vor der Aktivierung als Normwert (= 0 %-Lyse).

Die Lysequote wird also immer in Relativprozenten des Normwertes angegeben.

Wir haben in unserer Arbeit auf die Berechnung der LQ verzichtet und unsere Modifikation der Goossen'schen Standardpapierfibrinolysebestimmung nur an Hand vergleichender Messungen der Norm-E (ohne Plasmaaktivierung) getestet.

Dabei sollte gleichzeitig die physiologische Schwankungsbreite sowie das Vorhandensein einer Lyse im Normalplasma untersucht werden.

3.5 Statistische Auswertung

Die gemessenen E-Werte werden in Tabellen aufgeführt und statistisch ausgewertet. Durch die Berechnung der absoluten Standardabweichung s (auch mittlere quadratische Abweichung oder Streuung) und des Variationskoeffizientens kann die Aussagekraft der Meßreihen beurteilt werden. Gleichzeitig gibt sie ein Urteil über Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode.

Die Standardabweichung s ist ein Maß für die Variabilität, d.h. die Streubreite einer Meßreihe, und hat sich von allen möglichen Variabilitätsmaßen als am zweckmäßigsten erwiesen (14). Sie ist unabhängig von der Anzahl der Beobachtungen verwendbar und berücksichtigt im Gegensatz zur Bestimmung der Variationsbreite (Differenz zwischen größtem und kleinstem Wert) alle Einzelwerte. Sie wird folgendermaßen berechnet: Aus der Gesamtzahl n der Einzelwerte x_i wird zunächst der Mittelwert $\bar{x}$ errechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Nun wird die Abweichung jedes Einzelwertes vom Mittelwert gebildet und jede dieser Einzeldifferenzen quadriert. Die Summe der Abweichungsquadrate wird durch die Zahl der Bestimmungen minus 1 dividiert.

$$s = \frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Bei Normalverteilung eines Merkmals liegen genau 68,26 % aller Stichprobenwerte innerhalb von $\bar{x} \pm s$.

Betrachtet man den Vertrauensbereich von $\bar{x} \pm 2s$, so liegen 95,45 % aller Werte innerhalb dieser Grenzwerte. Nur 5 % aller Beobachtungen liegen außerhalb dieses Bereichs (14).

Anschließend wird der Variationskoeffizient VK (auch relative Standardabweichung) in Prozent gebildet:

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Um statistisch nachweisen zu können, ob beim Vergleich zweier Mittelwerte von Meßreihen an jeweils denselben Individuen ein signifikanter Unterschied vorliegt, wird der t-Test angewandt.

Für jedes einzelne Individuum wird die Differenz zwischen den Werten in beiden Meßreihen gebildet. Wenn zwischen beiden Reihen keinerlei Unterschied vorliegt (= Nullhypothese), so ist es unwahrscheinlich, daß das arithmetische Mittel dieser Differenzen "allzu" stark von Null abweicht.

Signifikanz liegt vor, wenn die zur entsprechenden Zahl der Freiheitsgrade der Meßreihe gehörende Signifikanzschwelle für den Wert t überschritten wird. Nur dann wird die Nullhypothese (es besteht kein Unterschied zwischen beiden Reihen) abgelehnt und bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 % bzw. 1 % der Schluß gezogen werden, daß sich die Mittelwerte signifikant unterscheiden. Diese Überschreitungswahrscheinlichkeit heißt auch Irrtumswahrscheinlichkeit P. In einer Tabelle (Student-Verteilung) sind die Signifikanzschwellen für t bei P = 5 % oder P = 1 % angegeben.

Der Wert von t wird folgendermaßen berechnet:

$$t = \frac{\text{mittlere Differenz}}{s_E} \times n$$

Zu diesem t-Wert gehören n-1 Freiheitsgrade fg.

Freiheitsgrad = Stichprobenumfang - 1

s_E = Standardabweichung der Einzeldifferenzen

n = Anzahl der Differenzen

4. Versuchsablauf und Versuchsbedingungen

Zunächst wurde ein Plasmapool angelegt: 500 ml Citratblut eines gesunden männlichen Spenders (Alter: 25 Jahre) wurden 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, das abgeheberte Citratplasma wurde in 95 Reagenzgläsern zu Portionen von je 2,5 ml Plasma mit Plastikstopfen verschlossen und bei -30°C eingefroren. Dieses Poolplasma läuft bei allen Messungen als Kontrollwert zum Vergleich mit. Es wird kurz vor dem Ansatz in Wasser von 37°C aufgetaut.

Aus folgender Übersicht soll der zeitliche Ablauf des Versuchs deutlich werden:

Versuchsserie	I	II	III
Versuchstag	1. - 10.	11. - 20.	21. - 30.
	1. Blutentnahme		2. Blutentnahme
Plasma des Doppelansatzes	frisch	gefrier	frisch gefrier (gestoppt)

In drei aufeinanderfolgenden Versuchsserien wird das Citratplasma von jeweils denselben 40 gesunden männlichen Probanden im Alter zwischen 20 und 26 Jahren untersucht. Bestimmt wird die fibrinolytische Aktivität nach der Standardpapierfibrinolyse von Goossens.

Bei der ersten Blutentnahme zu Beginn des Versuches werden von jedem Probanden 20 ml Citratblut entnommen, von dessen Citratplasma 5 ml zur anschließenden Bestimmung der Lyse von Frischplasma verwendet werden.

Der Rest wird als eine 5 ml - und eine 2 ml-Portion in Reagenzgläser gefüllt, verschlossen und bei -30°C eingefroren. Von diesem Gefrierplasma wird

- a) die 5 ml-Portion in der II. Versuchsserie in Wasser von 37°C aufgetaut und zur Bestimmung der Lyse von Gefrierplasma verwendet (jeweils Doppelansatz)
- b) die 2 ml-Portion in der III. Versuchsserie aufgetaut und

die Lyse des Plasmas mit AMCHA und Proteaseninhibitor (Trasy-
lol) gestoppt. Dieses gefrier-gestoppte Plasma wird in einem
Doppelansatz mit dem Frischplasma der zweiten Blutentnahme
(10 ml Citratblut von denselben 40 Probanden, die schon bei
der ersten Blutentnahme spendeten) in der III. Versuchsserie
getestet und verglichen.

An jedem einzelnen Versuchstag werden 4 Einzelplasmen in je
einem Doppelansatz untersucht. Dazu kommen noch 2 SFP-Streifen
mit Poolplasma und 2 Leerwertbestimmungen, so daß pro Ver-
suchstag 12 Bestimmungen durchgeführt werden.

Die Reihenfolge der Probanden wurde in allen 3 Versuchsserien
beibehalten, um bei jedem Einzelplasma denselben zeitlichen
Abstand zwischen den einzelnen Messungen zu haben.

Zu allen Bestimmungen wird SFP und Chromatographiepapier ohne
Fibrin (= Leerwertpapier) aus einer Charge verwendet. Aufbe-
wahrung des Papiers erfolgt verschlossen in Plastikhüllen bei
Kühlschrantemperatur (+4°C). Der Versuch begann eine Woche
nach Lieferung der von der Firma Macherey & Co. frisch herge-
stellten Charge.

5. Ergebnisse

5.1 Verbesserungen im technischen Ablauf der Methode

5.1.1 Arbeitserleichterung

Mit der von uns verwendeten Modifikation der Standardpapierfibrinolyse wird der Färbungs- und Entfärbungsvorgang automatisiert.

Beim bisherigen Handbetrieb mußte die Färbeflüssigkeit ausgegossen und anschließend alle 10 Minuten der Entfärber erneuert werden, bis die Entfärbeflüssigkeit klar blieb. Das bedeutete 10-15 maliges Wechseln, je nach Papiermenge. Der Laborant mußte also während der gesamten Versuchsdauer an der Schüttelmaschine stehen und konnte während dieser Zeit (ca. 160 Minuten) an nichts Anderem arbeiten.

Mit unserer Modifikation läuft der Entfärbevorgang nach dem Einfüllen der Amidoschwarzlösung in das Boxensystem über 3 Stunden hindurch automatisch ab. In dieser Zeit muß der Laborant nicht an der Maschine stehen. Zu dieser merklichen Arbeitserleichterung kommt noch die Verbesserung der äußeren Arbeitsbedingungen im Labor durch Wegfall des penetranten Geruchs des Elphorentfärbers, der bisher bei Entfärbung in der zeitweise offenen Glasschale auftrat.

5.1.2 Erhöhung der Anzahl der Bestimmungen

Die Anzahl der Bestimmungen kann mit unserem Boxensystem auf ein Vielfaches des bisherigen Verfahrens ausgedehnt werden. Beitinger und Schorer (10, 50) stellten fest, daß beim Handbetrieb mit der Glasschale (43 x 8 x 5 cm) die Bestimmung von mehr als 10 Streifen nicht empfehlenswert ist, da dann die Entfärbezeit auf über 4 Stunden ansteigt.

Wir führten bei unserem Versuch pro Ansatz 12 Bestimmungen durch. Das Boxensystem kann im Baukastensystem bei Bedarf um je 2 Boxen vergrößert werden. Dadurch würde sich lediglich der Verbrauch an Färbe- und Entfärbeflüssigkeit erhöhen, nicht aber die Entfärbezeit.

5.1.3 Ausschaltung von Fehlerquellen des Handbetriebes

Durch die teilweise Automatisierung der Methode fallen einige bekannte Fehlerquellen des Handbetriebs weg, wie z.B.:

- a) Wasserstrahl trifft die Papierstreifen beim Wässern, dabei zerknittern sie leicht oder reißen ein
- b) die Streifen kleben beim Färben und Entfärben in einer einzigen großen Glasschale leicht zusammen
- c) die Streifen schieben sich beim Abgießen des Entfärbers übereinander und werden dabei am Gefäßrand durch Reibung beschädigt.

Der Versuch mit den Entfärbeboxen und der Automatisierung des Entfärbevorgangs ist eine Stufe in der Weiterentwicklung der Papierfibrinolysebestimmung nach Goossens in Richtung auf eine vollständige Automatisierung der Lysebestimmung hin.

Die Zuverlässigkeit der automatischen Entfärbung in den Entfärbeboxen wird durch vergleichende Messungen geprüft und statistisch ausgewertet.

5.2 Versuche zur Bestimmung der Fehlerbreite der Methode

5.2.1 SFP ohne Plasmainkubation

Um auszuschließen, daß auftretende Fehler durch Qualitätsmängel des SFP zustande kommen, wurde zunächst die Anfärbbbarkeit des SFP in den einzelnen Boxen ohne vorherige Plasmainkubation verglichen und statistisch ausgewertet (Tabelle 1).

Die Teststreifen waren alle homogen angefärbt, es trat keine Fleckenbildung auf. Aus der niedrigen Standardabweichung und dem sehr kleinen Variationskoeffizienten kann geschlossen werden, daß das SFP gleichmäßig anfärbbar ist und der Färbe- und Entfärbevorgang in den einzelnen Boxen gleichmäßig abläuft. Die Qualität des SFP entspricht also den zu stellenden Anforderungen. Die Automatisierung liefert zuverlässige Werte mit einer geringen Standardabweichung.

Tabelle 1: Anfärbbbarkeit des SFP (Inkubation in Veronal-HCl-Puffer 20 Stunden bei 37°C)

Boxennummer	E-Wert	Boxennummer	E-Wert
1	380	7	375
2	376	8	375
3	381	9	365
4	382	10	370
5	384	11	263
6	376	12	264

} Leerwert

$$\bar{x} = 376 \begin{matrix} +8 \\ -11 \end{matrix}$$

$$s = 5,77$$

$$VK = 1,53$$

5.2.2 Leerwertbestimmungen

Dasselbe Ergebnis bezüglich der Zuverlässigkeit der Färbung und Entfärbung in den Boxen sowie der Papierqualität, brachte die Auswertung aller Leerwertbestimmungen.

An jedem Versuchstag wurde der E-Wert des Chromatographiepapiers ohne Fibrin in einer Doppelbestimmung untersucht.

Das ergab folgende Werte:

$$\bar{x} = 270 \begin{matrix} +15 \\ -13 \end{matrix}$$

$$s = 7,65$$

$$VK = 2,83$$

$$n = 30 \quad (\text{jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung})$$

Die Maschine gewährleistet also einen konstanten Färbungs- und Entfärbungsvorgang beim Leerwertpapier.

5.2.3 SFP in Poolplasma inkubiert

Als weiterer Versuch zur Bestimmung der Fehlerbreite der Methode wurden nun 10 SFP-Streifen jeweils in demselben Poolplasma inkubiert. Sechs Einzelportionen des eingefrorenen Poolplasmas wurden in einen Topf zusammengegossen, gemischt und für den Testansatz verwendet. Die E-Werte lagen dabei stärker gestreut als in den beiden vorhergehenden Bestimmungen.

Tabelle 2: Anfärbbarkeit des SFP (Inkubation in Poolplasma)

Boxennummer	E-Wert	Boxennummer	E-Wert
1	795	7	718
2	770	8	790
3	874	9	754
4	810	10	748
5	740	11	262
6	860	12	257

Leerwert

$$\bar{x} = 786 \begin{matrix} +88 \\ -68 \end{matrix}$$

$$s = 50,94$$

$$VK = 6,48$$

Wir beobachteten, daß die SFP-Streifen an ihrer Auflagefläche auf dem Boxenboden nicht so eindeutig homogen gefärbt waren wie die SFP-Streifen ohne Plasmainkubation oder die Leerwertstreifen. Die Auflageflächen des SFP zeigten kleinere Anfärbungsdifferenzen bis **kleine Flecken**.

Wir können die inhomogene Färbung der Auflagefläche einzelner

SFP-Streifen auf dem Boxenboden nur mit einem technischen Fehler beim Färben erklären. Es bilden sich unregelmäßige Flüssigkeitsreste unter dem SFP beim Ablauf der Amidoschwärzlösung durch Adhäsion des SFP am Boxenboden, die zu unregelmäßigen Anfärbungen der an das SFP adsorbierten Plasmaeiweiße führen.

Das Fibrin des SFP wird, wie vorher untersucht, gleichmäßig angefärbt. Die stabile Adsorption von Plasmaeiweiß an das Fibrinpapier, die trotz Wässerung bestehen bleibt, wurde von Scholle (49) beschrieben.

Die Standardabweichung dieser Meßreihe liegt erheblich höher als bei den vorangegangenen Bestimmungen des SFP ohne Plasmainkubation und damit auch der Variationskoeffizient.

In Prozenten ausgedrückt erhalten wir bei in Plasma inkubiertem SFP eine Variationsbreite (Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Meßwert) der E-Werte von $\pm 10\%$ zum Mittelwert. Weitere Überlegungen hierzu sind in der noch folgenden Diskussion darzulegen.

5.3 Physiologische Schwankungsbreite der fibrinolytischen Aktivität

Die physiologische Schwankungsbreite der lytischen Aktivität wurde in Versuchsserie I am Frischplasma von 40 gesunden männlichen Probanden im Alter zwischen 20 und 26 Jahren untersucht. Durch Befragung konnte die vorherige Einnahme von Medikamenten ausgeschlossen werden.

Die Werte der Meßreihe (Tabelle 3) liegen stark gestreut und haben eine ähnlich hohe Standardabweichung wie die der E-Werte des in Poolplasma inkubierten SFP.

Folgende Ursachen sind für die große Variationsbreite der Norm E zu nennen:

- a) Die Lyse von Normalplasma ist in ihrer Stärke unterschiedlich, je nach äußeren Lebensbedingungen (siehe Seite 11) kann sie gesteigert bzw. verringert sein.

Tabelle 3: Physiologische Schwankungsbreite der Norm E
(jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung, zugehörige Pool (P)- und Leerwerte (L) unterstrichen)

Streifen-Nr.	E-Wert	Streifen-Nr.	E-Wert	Streifen-Nr.	E-Wert	Streifen-Nr.	E-Wert
1	541	13	725	25	603	33	629
2	603	14	721	26	760	34	909
3	626	15	629	27	820	35	913
4	553	16	687	28	725	36	705
P	<u>821</u>	P	<u>748</u>	P	<u>615</u>	P	<u>670</u>
L	<u>263</u>	L	<u>265</u>	L	<u>262</u>	L	<u>262</u>
5	626	17	766	29	549	37	674
6	729	18	772	30	632	38	643
7	674	19	712	31	764	39	578
8	588	20	699	32	680	40	683
P	<u>658</u>	P	<u>620</u>	P	<u>754</u>	P	<u>862</u>
L	<u>263</u>	L	<u>263</u>	L	<u>263</u>	L	<u>268</u>
9	720	21	590	$\bar{x} = 679 \begin{matrix} +141 \\ -138 \end{matrix} \quad (\text{Norm E})$ $s = 53,78$ $VK = 7,96$			
10	653	22	590				
11	736	23	630				
12	685	24	617				
P	<u>674</u>	P	<u>630</u>				
L	<u>266</u>	L	<u>261</u>				

Um vergleichbare Werte zu erhalten ist es deshalb wichtig, daß nicht nur die Methode der Lysebestimmung standardisiert ist, sondern auch der Zustand, in dem die Patienten untersucht werden: sie sollten nüchtern und ausgeruht sein. Diese Bedingung war in unserem Versuch nicht gegeben.

- b) Wie schon beschrieben, kommt es zu einer stabilen Adsorption von Plasmaproteinen an das SFP. Die Plasmaproteine werden angefärbt, dadurch erfolgt eine zusätzliche Farbstoffaufnahme des SFP, die proportional dem Plasmaproteingehalt ist (27).

Damit sind bei verschieden hohem Plasmaproteingehalt unterschiedlich hohe E-Werte von 40 Einzelplasmen zu erklären.

- c) Neben diesen biologischen Ursachen für eine erhebliche Streubreite bei der Bestimmung der physiologischen Schwankungsbreite der lytischen Aktivität liegen weitere Ursachen in Fehlerquellen bei der Durchführung der Methode, die gesondert abgehandelt werden.

5.4 Vergleich der Lyse von Frischplasma und Gefrierplasma

In der Versuchsserie II wurden die nach der ersten Blutentnahme eingefrorenen Einzelportionen der 40 Probanden in Wasser von 37°C wieder aufgetaut und ihre Lyse in je einem Doppelansatz untersucht.

Das Plasma war 10 Tage lang bei -37°C eingefroren. Die E-Werte des Gefrierplasmas sind in Tabelle 4 aufgeführt.

5.4.1 Vergleich von Frischplasma aus Serie I mit Gefrierplasma

Proz der hohen Standardabweichung läßt sich zwischen der Frischserie I und der Gefrierplasmaserie II ein signifikanter Unterschied statistisch errechnen.

Mittels t-Test werden die Mittelwerte $\bar{x}_I = 679$ und $\bar{x}_{II} = 738$ und die dazugehörigen Meßreihen verglichen:

$$s_E = 107,87$$

$$t = 3,62$$

Nach der Student-Verteilung (14) liegt für $t > 2,704$ bei 39 Freiheitsgraden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 1\%$ ein signifikanter Unterschied vor.

5.4.2 Vergleich von Frischplasma aus Serie III mit Gefrierplasma

Zieht man die E-Werte des Frischplasmas aus Serie III (Tabelle 5) zum Vergleich mit den Gefrierplasmawerten aus Serie II heran, ergibt sich ein anderes Ergebnis.

Werte zu Tabelle 5:

	Frischplasma = Wert IIIa	Gefrierplasma (gestoppt) = Wert IIIb
$\bar{x}$	$+123$ 757 -127	$+165$ 800 $- 66$
s	48,75	60,24
VK	6,44	7,53

Beim Vergleich der Mittelwerte $\bar{x}_{IIIa} = 757$ und $\bar{x}_{II} = 738$ und ihrer zugehörigen Meßreihen kann mit dem t-Test kein signifikanter Unterschied errechnet werden.

$$s_E = 72,92$$

$$t = 1,144$$

Für $t < 2,704$ liegt bei 39 Freiheitsgraden mit $P = 1\%$ kein signifikanter Unterschied vor.

Es liegt die Vermutung nahe, daß die E-Werte der gesamten Versuchsserie I im Vergleich zu den Serien II und III zu niedrig liegen.

Begründung: Am 10. Versuchstag (ab Leerwert-Nummer 10) wurde in den Zulaufschlauch von der Pumpe in die Entfärboxen ein Rückschlagventil eingebaut, so daß nach der Ausschaltung der Pumpe durch das Zeitschaltwerk kein weiterer Entfärber durch den Schlauch laufen konnte.

Tabelle 4: Mittelwerte der Extinktion von Gefrierplasma
(Serie II). Zugehörige Pool (P)- und Leerwerte (L)
unterstrichen.

Strei- fen-Nr.	E-Wert	Strei- fen-Nr.	E-Wert	Strei- fen-Nr.	E-Wert	Strei- fen-Nr.	E-Wert
1	667	13	730	25	790	33	742
2	828	14	720	26	810	34	790
3	650	15	649	27	825	35	730
4	750	16	695	28	690	36	810
P	<u>918</u>	P	<u>795</u>	P	<u>680</u>	P	<u>778</u>
L	<u>275</u>	L	<u>265</u>	L	<u>276</u>	L	<u>265</u>
5	752	17	768	29	710	37	694
6	750	18	756	30	677	38	690
7	794	19	731	31	725	39	708
8	796	20	647	32	779	40	806
P	<u>753</u>	P	<u>662</u>	P	<u>663</u>	P	<u>847</u>
L	<u>278</u>	L	<u>260</u>	L	<u>266</u>	L	<u>277</u>
9	705	21	766	$\bar{x}_{II} = 738 \begin{matrix} +90 \\ -91 \end{matrix}$ $s = 46,02$ $VK = 6,21$			
10	758	22	753				
11	826	23	710				
12	721	24	758				
P	<u>682</u>	P	<u>628</u>				
L	<u>263</u>	L	<u>264</u>				

Tabelle 5: Versuchsserie III. Extinktionswerte der Frischplasma (2. Blutentnahme) = 1. Wert und Gefrierplasma mit Antifibrinolyseinzusatz = 2. Wert. Zugehörige Pool (P)- und Leerwerte (L) unterstrichen.

Nr.	E-W.	Nr.	E-W.	Nr.	E-W.	Nr.	E-W.	Nr.	E-W.
1	800 822	9	830 1065	17	727 797	25	734 740	33	710 844
2	763 809	10	760 760	18	746 820	26	740 834	34	710 762
3	718 754	11	680 746	19	658 760	27	790 840	35	630 631
4	810 820	12	725 800	20	706 734	28	802 754	36	742 826
P	<u>847</u>	P	<u>865</u>	P	<u>769</u>	P	<u>734</u>	P	<u>744</u>
L	<u>277</u>	L	<u>275</u>	L	<u>287</u>	L	<u>274</u>	L	<u>270</u>
5	706 770	13	740 746	21	821 871	29	862 762	37	708 965
6	834 894	14	735 825	22	790 850	30	690 674	38	710 736
7	794 790	15	750 784	23	870 846	31	745 739	39	740 816
8	776 792	16	755 855	24	710 730	32	788 806	40	880 814
P	<u>691</u>	P	<u>820</u>	P	<u>828</u>	P	<u>719</u>	P	<u>805</u>
L	<u>272</u>	L	<u>282</u>	L	<u>278</u>	L	<u>278</u>	L	<u>278</u>

Bis zu diesem Versuchstag lief stets eine gewisse Menge Entfärberflüssigkeit in die Boxen nach. Dadurch erhöhte sich die Menge des Elphorentfärbers während der einzelnen Entfärbephasen, es trat eine stärkere Entfärbung ein und wir erhielten niedrigere E-Werte während der Versuchsserie I (Versuchstag 1 bis 9).

Als Bestätigung dieser Annahme fanden wir folgende Mittelwerte:

Mittelwert der Leerwerte 1 - 9: $\bar{x}_L = 263$ $\begin{matrix} +3 \\ -2 \end{matrix}$

Mittelwert der Leerwerte 10-30: $\bar{x}_L = 273$ $\begin{matrix} +14 \\ -13 \end{matrix}$

Mittelwert der Poolwerte 1 - 9: $\bar{x}_P = 687$ $\begin{matrix} +134 \\ -72 \end{matrix}$

Mittelwert der Poolwerte 10-30: $\bar{x}_P = 762$ $\begin{matrix} +156 \\ -134 \end{matrix}$

Leerwerte und Poolwerte der Versuchstage 1 bis 9 liegen also niedriger als die Vergleichswerte der Tage 10 bis 30.

Zusammenfassend läßt sich beim Vergleich der Lyse von Frischplasma und Gefrierplasma sagen, daß sich die Lyse nach zehntägigem Einfrieren des Plasmas nicht ändert.

5.5 Vergleich der E-Werte ungestoppter und gestoppter Plasmen

Wir untersuchten in Versuchsserie III die Frage, ob im Normalplasma gesunder männlicher Probanden lytische Aktivitäten vorhanden sind. Dazu wurde zunächst Gefrierplasma sofort nach dem Auftauen (in Wasser von 37°C) mit Antifibrinolysin, das in sterile Veronal-HCl-Puffer-Flaschen eingebracht wurde, versetzt:

AMCHA 1mg/ml

Trasylo1 300E/ml

Damit wurde jegliche lytische Aktivität im Testplasma gestoppt (17, 43).

Dieser sog. gefrier-gestoppte Ansatz wurde bezüglich seiner Lyse mit dem Frischplasma der 2. Blutentnahme in je einem Doppelansatz untersucht und verglichen (Tabelle 5).

5.5.1 Vergleich der E-Werte von ungestopptem Frischplasma und gestopptem Gefrierplasma

Mittels t-Test wird die Meßreihe IIIa mit ihrem Mittelwert $\bar{x}_{IIIa} = 757$ und die Meßreihe IIIb mit dem Mittelwert $\bar{x}_{IIIb} = 800$ verglichen:

$$s_E = 80,65$$

$$t = 3,899$$

Mit $P = 1\%$ liegt hier eine signifikante Erhöhung der E-Werte der Reihe IIIb vor ($t = 2,704$ bei 39 Freiheitsgraden). 80% der gefrier-gestoppten E-Werte liegen über den frisch-ungestoppten E-Werten derselben Probanden (Abb. 3).

5.5.2 Vergleich der E-Werte von ungestopptem Gefrierplasma mit gestopptem Gefrierplasma

Die Meßreihen II mit $\bar{x}_{II} = 738$ und IIIb mit $\bar{x}_{IIIb} = 800$ werden im t-Test verglichen:

$$s_E = 107,65$$

$$t = 3,605$$

Wiederum liegt ein signifikanter Unterschied bei $P = 1\%$ ($t = 2,704$ bei 39 Freiheitsgraden) vor.

Auch hier liegen bei 32 von 40 Wertepaaren ($= 80\%$) die gestoppten E-Werte über den ungestoppten Werten derselben Probanden (Abb. 4).

In beiden vergleichenden Messungen liegen die E-Werte gestoppter Plasmen über den ungestoppten Vergleichswerten. Wir kommen daher zu dem Ergebnis, daß im Plasma gesunder Probanden eine spontane Lyse vorhanden ist.

In den Abbildungen 3 und 4 soll dies verdeutlicht werden:

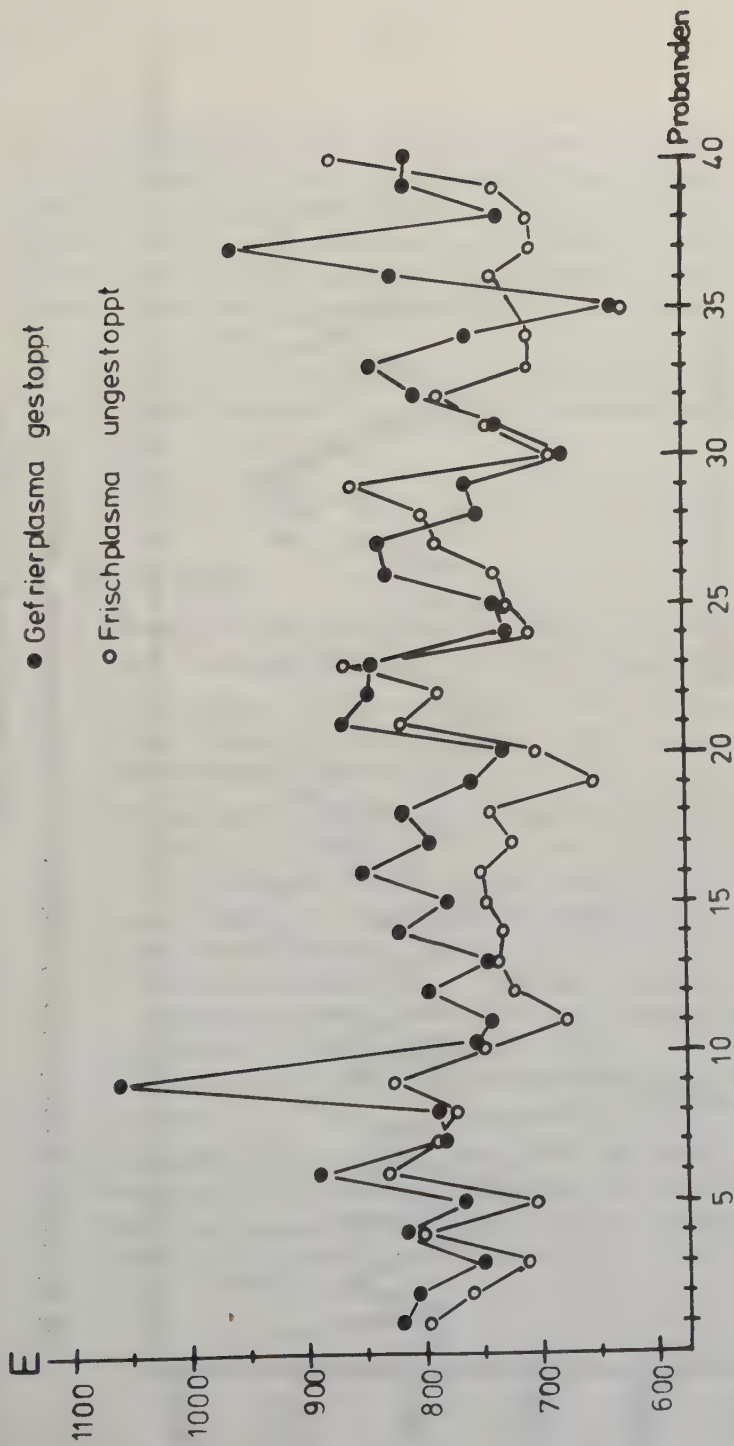


ABB.3: Vergleich der Extinktionswerte von Gefrierplasma gestoppt und Frischplasma ungestoppt

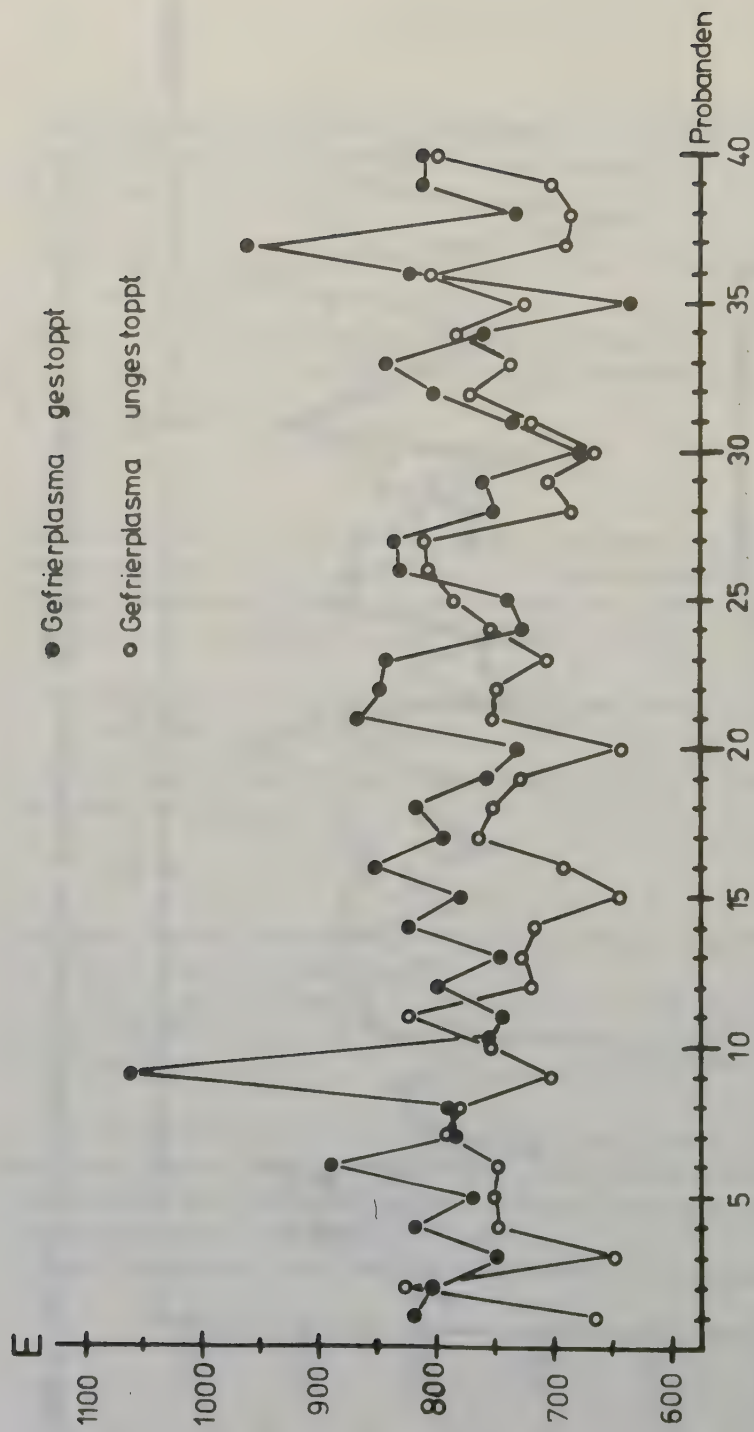


ABB. 4: Vergleich der Extinktionswerte von Gefrierplasma gestoppt

und Gefrierplasma ungestoppt

Lytische Spontanaktivität ist in den Plasmen vorhanden, bei denen der ungestoppte Wert unter dem gestoppten E-Wert liegt. Nähern sich die Wertepaare oder liegen die gestoppten E-Werte im Bereich der Fehlerbreite der Methode sogar niedriger als die ungestoppten Werte, so darf man annehmen, daß bei diesen Plasmen keine bemerkenswerte Spontanaktivität vorhanden war.

Man sollte das sog. Normalplasma vor der Bestimmung der Norm E mit Antifibrinolysin stoppen, um jegliche Spontanlyse ausschließen zu können.

5.6 Fehlerquellen

- 1) SFP muß trocken und luftdicht verpackt unter Lichtabschluß aufbewahrt werden bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank (50).
- 2) Beschädigung der Fibrinschicht auf dem SFP durch Pinzette, Knicke und Fingerabdrücke führt zu starken Abweichungen der E-Werte (50).
- 3) Die verwendeten Reagenzien müssen eine konstante Zusammensetzung haben:
 - a) Nur frischen Veronalpuffer verwenden; ausgeflockter Puffer ist für den Testansatz unbrauchbar, da sich der ph-Wert ändert.
 - b) Elphorentfärber muß eine konstante Temperatur (20°C , Zimmertemperatur) haben (10). Bei höherer Temperatur erhält man niedrigere E-Werte.
 - c) Amidoschwarzlösung vor Gebrauch schütteln (Bodensatz).
- 4) Die Entfärboxen müssen nach jeder Bestimmung mit Natronlauge 0,1 N durchgespült werden. Es bildet sich sonst im Boxensystem ein Rückstand der Amidoschwarzlösung.

- 5) Luftblasen, die bei der Inkubation des Streifens auftreten können, müssen entfernt werden, da sie eine gleichmäßige Benetzung mit Plasma verhindern.
- 6) Technische Fehlerquellen:
 - a) Pipettierfehler
 - b) Fehler beim Papierschneiden (Papierschneidemaschine muß stets scharf sein).
 - c) Adhäsion der Papierstreifen am Boxenboden beim Ablauf der Färbe- oder Entfärbeflüssigkeit. Dadurch bilden sich Flüssigkeitsreste unter dem SFP, die zu inhomogener Anfärbung der Streifen führen. Legt sich das Papier über die Ablauföffnung der Box, so entsteht ein Flüssigkeitsstau.

6. Diskussion

6.1 Zur Methode

Die teilweise Automatisierung der standardisierten Fibrinolysebestimmung nach Goossens (25) bringt eine deutliche Arbeitserleichterung.

Bezüglich der Fehlerbreite der Methode liegen unsere Ergebnisse bei den Leerwertbestimmungen und den Bestimmungen von nicht inkubiertem SFP innerhalb der beim Handbetrieb angegebenen Werte.

Leerwerte: VK = 2,83
(n = 30)

Beitinger (10): VK = 2,22
(n = 4)

SFP-Anfärbbarkeit:

Schorer (50):

VK = 1,53
(n = 10)

VK = 2,09
(n = 8)

Bei Plasmainkubation von SFP zeigen unsere Meßreihen eine hohe Standardabweichung mit großem Variationskoeffizienten:

s = 50,94 / VK = 6,48

Sie sind, soweit sie mit den Ergebnissen des Handbetriebes von Schorer und Beitinger überhaupt vergleichbar sind, schlechter als diese.

Beitingers Werte der Norm E ergaben einen VK = 2,28. Sie wertete jeweils einen SFP-Streifen mit dem Plasma und Gefrierplasma eines Probanden viermal im Abstand von einem Monat aus, bestimmte also den Variationakoeffizienten der E-Werte von 4 SFP-Streifen. Jeder Streifen wurde in 5 Teilfolien zerschnitten und in 5 Einzelbestimmungen ausgewertet.

Schorer führte eine Mehrfachbestimmung am gleichen Plasma mit 6 verschiedenen SFP-Streifen durch und teilte jeden Streifen in 5 Einzelfolien von $1,0 \times 3,0$ cm.

Wir untersuchten in jeder Meßreihe 40 Streifen ohne sie in Teilfolien zu zerschneiden, folglich ist die Chance für das Auftreten jeder einzelnen Fehlerquelle der Methode bei uns ca. siebenmal größer als bei der Untersuchung von nur 6 Streifen.

Da das SFP eine einheitlich anfärbbare Fibrinschicht besitzt (siehe Seite 24) liefert uns der E-Wert des Gesamtstreifens (Randzonen werden weggeschnitten) bereits den Mittelwert der E-Werte der 5 Einzelfolien. Nach unserer Auffassung erübrigt sich deshalb die 5-fache Teilbestimmung.

Einzelne technische Probleme konnten wir lösen: Das Nachlaufen von Entfärberflüssigkeit in die Boxen wurde durch Einbau eines Rückschlagventils in die Schlauchverbindung von der Pumpe zum Boxensystem gestoppt.

An den Rändern des Deckelverschlusses der Boxen drang während der Schüttelphasen der Entfärbung stets Elphorflüssigkeit durch: wir befestigten weichen Schaumgummi (Dicke: 2cm), der mit einer dünnen PVC-Folie überzogen wurde, an der Unterseite des Deckels und konnten so einen dichten Boxenverschluß erreichen.

Bestehen bleibt das Problem der Adhäsion der Papierstreifen am Boxenboden. Dabei kann es zu unregelmäßigen Flüssigkeitsresten unter den Streifen und zu einer Abflußbehinderung

kommen. Diese technische Unregelmäßigkeit wird für die zum Teil inhomogene Anfärbung des SFP verantwortlich gemacht. Wir versuchten, durch Einlegen von Kunststoffgittern dieses Problem zu lösen. Auf den getrockneten Papierstreifen war das Gittermuster in einem helleren Farbton abgebildet.

In weiteren Untersuchungen muß die technische Seite dieser Modifikation der Standardpapierfibrinolyse weiter verbessert und auf ihre Fehlerquellen hin untersucht werden. Ein Boxensystem aus einem Material, das durchsichtig ist, wäre hierbei sehr wertvoll, um die Lage der Papierstreifen in jeder Phase verfolgen zu können.

6.2 Physiologische Schwankungsbreite der Norm E

Mögliche Ursachen für die sehr hohe Variationsbreite unserer Meßreihe wurden bereits diskutiert (siehe 5.3).

Für eine endgültige Aussage über die physiologische Schwankungsbreite der Norm E sollte ein Großfeldversuch durchgeführt werden, bei dem die Probanden in nüchternem und ausgeruhtem Zustand morgens untersucht werden.

Wegen des unterschiedlich hohen Plasmaproteingehaltes ergibt sich eine verschieden starke Anfärbung des SFP und somit unterschiedlich hohe Extinktion, unabhängig von der tatsächlich vorhandenen Lyse des Plasmas. Bei einer Bestimmung der physiologischen Schwankungsbreite oder allgemein der bei einzelnen Patienten vorhandenen Lyse sollte dieser überlagernde Effekt durch vorherige Gesamteiweißbestimmung des Plasmas berücksichtigt werden.

6.3 Gefrierplasma

Nach unserer Untersuchung ändert sich die Lyse von nicht aktiviertem Gefrierplasma, das 10 Tage lang bei -30°C eingefroren war, nicht.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch andere Autoren, allerdings bei Untersuchungen der Lyse von aktiviertem Plasma:

Meneghini (44) fand eine gleichbleibende Lyse von Citratblut über 3 Monate hindurch (Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe bei -28°C).

Nach Sherry und Alkjaersig (52b) verschwindet die Lyse erst nach einigen Monaten.

Bei eingefrorenem und wieder aufgetautem Citratblut muß in Betracht gezogen werden, daß die Zytolyse von Erythrozyten und anderen korpuskulären Bestandteilen des Blutes die Lyse beeinflußt. Nach Eichenberger et al. (16) geben Leukozyten, wahrscheinlich auch Erythrozyten, Kinasen ab, die im Blut vorhandene Profibrinolysokinasen in plasmatische Fibrinolysokinasen überführen.

Beitinger (10) beschreibt eine konstante Lysequote von frisch eingefrorenem (-30°C) Citratplasma über 5 Monate hindurch, anschließend trat eine niedrigere Lysequote ein.

Über die Aktivitätsminderung einzelner Faktoren des fibrinolytischen Systems in bestimmten Zeiträumen liegen einige Untersuchungen vor:

Spöttl (56) untersuchte den Proaktivatorgehalt von Gefrierplasma (-25°C) und konnte über einen Zeitraum von 4 Monaten keinen signifikanten Aktivitätsverlust feststellen.

Nach Loomis (40) verliert Plasminogen ebenso wie Plasmin bei -40°C schon in einigen Wochen seine Aktivität.

Die Aktivität der Antiplasmine bleibt in vitro bei -7°C nur 1 - 2 Monate lang erhalten (57). Jürgens (33) fand, daß aus zytolysierten Thrombozyten ein Fibrinolyseinhibitor mit ausgesprochener Antiaktivatoreigenschaft freigesetzt wird. Dieser könnte dann im Gefrierplasma nach einer bestimmten Zeit den Abfall der Lyse bewirken.

Auf Grund der mindestens 5 Monate währenden Haltbarkeit kann man das Plasma eines Probanden bei -30°C einfrieren und zu Vergleichstesten mit Frischplasma heranziehen.

6.4 Bestimmung der Norm E (= 0%-Lyse)

Dieser Wert ist bei jeder Berechnung der Lysequote von Bedeutung, weil er im Nenner der LQ-Formel auftaucht. Jede LQ wird in Relativprozenten des Normwertes angegeben. Seine Ermittlung stellt ein besonderes Problem dar:

Wegen der Plasmaproteinadsorption an das SFP kann der E-Wert nach Anfärbung von nicht inkubiertem SFP nicht verwendet werden, da sich eine negative Lysequote ergäbe (siehe 3.4). Zur Bestimmung des tatsächlichen 0%-Lysewertes muß jegliche lytische Aktivität des Testplasmas vor der Inkubation gestoppt werden.

Scholle (49) und Sippos (55) konnten bei Zugabe von EACA allein zum Testansatz keinen Lysestopp erreichen. Sippos nahm daher die höchste gemessene Extinktion von ungestopptem Normalplasma als 0%-Lysewert.

Bei der standardisierten Fibrinolysebestimmung nach Goossens gilt als Norm E der E-Wert eines Mischplasmas von 3 oder mehr gesunden Versuchspersonen, wobei der Zusatz von Antifibrinolysin empfohlen wird. Bei Bestimmung der Lysequote nach Aktivierung desselben Plasmas gilt der Ausgangswert als Normwert.

Wir konnten durch Zusatz von AMCHA (1 mg/ml) und Trasylol (300 E/ml) zum Veronal-HCl-Puffer signifikant erhöhte E-Werte des gestoppten Plasmas gegenüber dem ungestoppten Normalplasma nachweisen. Es empfiehlt sich demnach bei der Bestimmung der Norm E (0%-Lyse) das Normplasma mit Antifibrinolysin zu inkubieren, um jegliche lytische Aktivität ausschließen zu können. Ebenso ist der Zusatz von Antifibrinolysin zu Plasmen, die für spätere Vergleichsbestimmungen mit Frischplasma herangezogen werden sollen, vor dem Einfrieren als notwendig zu fordern.

7. Zusammenfassung

- 1) Eine neue Modifikation der von Goossens (25) inaugurierten Standardpapierfibrinolyse-Bestimmung wird beschrieben und auf Fehlerquellen untersucht.
- 2) Die technische Modifikation besteht in der Einführung der automatischen Färbung und Entfärbung in einem Boxensystem auf einer Schüttelmaschine.
Sie ermöglicht die Ausschaltung von Fehlerquellen des Handbetriebs, eine Erhöhung der Anzahl der Bestimmungen und bringt Arbeitserleichterungen mit sich.
- 3) Der Variationskoeffizient (VK) als Maß für die Meßmethodengenauigkeit beträgt:
für Extinktionswerte des Chromatographiepapiers (Leerwert):
 $VK = 2,83$
für Extinktionswerte des Standardfibrinpapiers ohne Plasmainkubation: $VK = 1,53$
Die Methode gewährleistet eine zuverlässige Färbung und Entfärbung des Chromatographiepapiers sowie des Standardfibrinpapiers und ist gut reproduzierbar.
- 4) Mit dieser technischen Modifikation wurde zunächst am Plasma von 40 gesunden männlichen Probanden die spontane fibrinolytische Aktivität (Norm E) bestimmt.
Hierbei ergab sich eine große physiologische Schwankungsbreite der lytischen Aktivität im Normalplasma ($VK = 7,96$).
Als Ursachen für die starken Schwankungen der Lysewerte werden diskutiert:
nicht standardisierter Zustand der Probanden und
Anlagerung von Plasmaproteinen an das Standardfibrinpapier.
- 5) Die spontane fibrinolytische Aktivität von Gefrierplasma

(-30°C) ändert sich gegenüber den Werten des Frischplasmas 10 Tage lang nicht. (n = 40)

- 6) Mit Antifibrinolytika (AMCHA und Trasylol) inkubierte und dadurch gestoppte Testplasmaansätze liefern signifikant höhere Extinktionswerte als ungestoppte Ansätze. Dabei ließ sich bei 32 von 40 Versuchspersonen (= 80%) eine Spontanlyse nachweisen.

Daraus muß gefolgert werden, daß zur Bestimmung der O%-Lyse (Norm E) und bei Verwendung von Gefrierplasma sog. gesunder Normalpersonen als Vergleichswert der Testansatz mit Antifibrinolysin gestoppt werden muß, um eine Spontanlyse im Plasma ausschließen zu können.

Literaturverzeichnis

- 1) Albrechtsen, O.K.: The fibrinolytic activity of human tissues. J. Brit. Haemat. 3, 284, 1957
- 2) Albrechtsen, O.K. and Hess-Thaysen, J.: Fibrinolytic activity in human saliva. Acta physiol. scand., 35, 138, 1955
- 3) Ambrus, J.L., Ambrus, C.M., Back, N., Sokal, J.E., Collins, G.L.: Clinical and experimental studies on the fibrinolytic enzymes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 68, 97, 1957
- 4) Ambrus, T., Markus, G.: Plasmin-Antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolytic enzymes. Amer. J. Physiol. 199, 491, 1966
- 5) Astrup, T.: Activators and inhibitors of fibrinolysin. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. X, 147, 1958
- 6) Astrup, T., Albrechtsen, O.K.: Estimation of the plasminogen activator and the trypsin inhibitor in animal and human tissues. Scand. J. clin. Lab. Invest. 9, 233, 1957
- 7) Astrup, T., Müllertz, St.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. 40, 346, 1952
- 8) Astrup, T. and Sterndorff, I.: A fibrinolytic system in human milk. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 605, 1953
- 9) Astrup, T. and Sterndorff, I.: An activator of plasminogen in normal urine. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 675, 1952
- 10) Beitinger, B.: Über die fibrinolytische Aktivität von Humanplasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, gemessen mit der Standardpapierfibrinolyse. Med. Diss. München 1973
- 11) Beller und Glas, P.: Inhibition of clotting as the result of plasminogen activation by streptokinase.
II: Analytical studies of the clotting mechanism.
Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. V, No. 3/4, 520, 1960

- 12) Boudreaux, H.B., Frampton, V.L.: A peanut factor for haemostasis in haemophilia. *Nature (Lond.)*, 185, 469, 1960
- 13) Buckell, M., Elliot, F.A.: Diurnal fluctuation of plasma fibrinolytic activity in normal males. *Lancet* 1, 660, 1959
- 14) Cavalli-Sforza, L.: Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. G. Fischer, Stuttgart 1972, pp. 34, 45, 74
- 15) Christensen, L.R.: Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. *J. gen. Physiol.* 28, 363, 1945
- 16) Eichenberger, E., Schmidhauser-Kopp, M., Hurmi, H., Fricay, M., Westphal, O.: Biologische Wirkungen eines hochgereinigten Pyrogens aus *Salmonella abortus equi*. *Schweiz. med. Wschr.* 85, 1190, 1955
- 17) Eisen, V.: *Proc. roy. Soc. Med.* 59, 302, 1966
- 18) Fantl, P., Simon, S.E.: *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 26, 521, 1958
- 19) Fearnley, G.R., Ferguson, L., Charrabati, R., Vincent, C.T.: Effect of beer on blood fibrinolytic activity. *Lancet* 1, 184, 1960
- 20) Fearnley, G.R.: *Fibrinolysis*. Edward Arnold Publishers LTD, London 1965, pp. 14-16
- 21) Goodpasture, E.W.: *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 25, 330, 1914
- 22) Goossens, N., Walcher, A.: Paper-Fibrinolysis - A new quantitative photometric fibrinolysis method. *Proc. of the IX. Congr. of the Internat. Soc. of Haematol.*, Vol. II, 271, Mexico 1962, S. Karger 1963
- 23) Goossens, N., Walcher, A.: Spontaneous Paperfibrinolysis. *XI. Congr. of the Internat. Soc. of Haematol.*, Sydney 1966
- 24) Goossens, N.: Über Fibrinolyseaktivierung in vitro und in vivo durch Nikotinsäure, Heparin und deren Mischungen. *Med. Welt*, 14, 899, 1967

- 25) Goossens, N.: Standardisierte Fibrinolysebestimmung.
Med. Welt, 21, 1816, 1970
- 26) Graf, U., Henning, H.J.: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Springer-Verlag, 3.Aufl. 1960
- 27) Graßmann, W., Hannig, K.: Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 290, 1, 1952
- 28) Hartert, H.: Die Thrombelastographie. Eine Methode zur physikalischen Analyse des Blutgerinnungsvorganges.
Z. ges. exp. Med., 117, 189, 1951
- 29) Heimbürger, N.: Neuere Erkenntnisse über den Mechanismus der Fibrinolyse unter besonderer Berücksichtigung der Fibrinagar-Elektrophorese. Behringwerk-Mitt. 41, 84, 1962
- 30) Hess, H., Goossens, N.: Behandlung rezidivierender Embolien in Extremitätenarterien mit Streptokinase und Urokinase. Fortschr. Med. 84, 296, 1966
- 31) Jaenecke, J.: Antikoagulantien- und Fibrinolysetherapie. Thieme Stuttgart 1971, pp. 7-9, 29-56, 130, 131
- 32) J. clin. Invest, 38, 1086, 1959
- 33) Jürgens, J.: Über die Rolle der Thrombozyten und Retraction bei der Thrombolyse; in Hiemeyer, V.: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse. F.K. Schattauer Stuttgart 1969, pp. 199-205
- 34) von Kaulla, K.N., Schultz, R.L.: Methods for the evaluation of human fibrinolysis. Amer. J. clin. Path., 29, 1041, 1958
- 35) Koller, F.: Fibrinolyse. Schweiz. Med. Wschr. 44, 1233, 1966
- 36) Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. gen. Physiol., 30, 291, 1947

- 37) Kwaan, H.C., Mac Fadzean, A.J.: Inhibition of fibrinolysis in vivo by alimentary cholesterol. *Nature* 179, 260, 1957
- 38) Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik. 4, Behringwerke 1969
- 39) Lassen, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. *Acta physiol. scand.* 27, 371, 1952
- 40) Loomis, E.: Fibrinolysin and antifibrinolysin. A proteolytic enzyme in blood. Blood clotting and allied problems. Transaction of the 5th Conf., Josiah Macy, Jr. Foundation, 1952, p. 280
- 41) Macfarlane, R.G., Biggs, R.: *Lancet* 1946/II, 862
- 42) Marx, R.: Blutstillung mit Fibrinolyseinhibitoren. *Münch. med. Wschr.*, 108, 1267, 1966
- 43) Marx, R.: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie. Bd. 2, S.89. F.K. Schattauer, Stuttgart 1967
- 44) Meneghini, P.: Transfusion de plasma fibrinolytique dans le traitement de la thrombose. *Transact. 6th Congr. Europ. Soc. of Haemat. Copenhagen* 1957
- 45) Nilsson, I.M., Björkman, S.E., von Studnitz, W., Hallen, A.: Antifibrinolytic activity of certain pectins. *Thromb. Diath. haemorrh.* 6, 177, 1961
- 46) Painter, R.H., Charles, A.F.: Characterization of a soluble plasminogen activator from kidney cell cultures. *Amer. J. Physiol.*, 202, 1125, 1962
- 47) Ratnoff, O.D., Pritchard, A., Colopy, J.A.: *New Engl. J. Med.* 253, 63, 1955
- 48) Schmutzler, R.: Indikation und praktische Durchführung der thrombolytischen Therapie; in Zuckschwerdt, L.; Thies, H.A.: Experimentelle und therapeutische Fibrinolyse. F.K. Schattauer Stuttgart 1963

- 49) Scholle, E.: med. Diss. München 1964
- 50) Schorer, B.: Über die Standardisierung und Vereinfachung der Spontanpapierfibrinolyse (Eluationsmethode). Med. Diss. München 1970
- 51) Schwick, H.G., Heimbürger, N.: Biochemie der Fibrinolyse; in Hiemeyer, V.: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse. F.K. Schattauer Stuttgart 1969, pp. 9-26
- 52) Sherry, S.: The fibrinolytic activity of streptokinase activated human plasmin. J. clin. Invest. 33, 1054, 1954
b) Sherry, S., Alkjaersig, N.: Studies on the activation of human plasminogen. J. clin. Invest. 35, 735, 1956
- 53) Sherry, S., Fletcher, A.P., Alkjaersig, N.: Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man. Physiol. Rev. 39, 343, 1959
- 54) Shulman, S., Alkjaersig, N., Sherry, S.: Physicochemical studies on human plasminogen and plasmin. J. biol. Chem. 233, 91, 1958
- 55) Sipos, J.: Zur Methode der Spontanpapierfibrinolyse. Med. Diss. München 1967
- 56) Spöttl, F.: Die Bestimmung des Proaktivators des fibrinolytischen Systems mit einer quantitativen kaseinolytischen Methode. Thromb. Diath. haemorrh. 18, 393, 1967
- 57) Stamm, H.: Einführung in die Klinik der Fibrinolyse. S. Karger Basel 1962
- 58) Storm, O.: Fibrinolytic activity in human tears. Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 55, 1955
- 59) Tagnon, H.J., Whitmore, W.F., Schulman, P., Kravitz, S.C.: Cancer 6, 63, 1953
- 60) Tillett, W.S., Garner, R.L.: The fibrinolytic activity of haemolytic streptococci. J. exp. Med. 58, 485, 1933
- 61) Weiner, A.E., Reid, D.E., Roby, C.C.: Amer. J. Obstet. Gynec. 66, 465, 1953

- 62) Williams, J.R.B.: The fibrinolytic activity of urine.
Brit. J. exp. Path. 32, 530, 1951
- 63) Winkelmann, G.: Die thrombolytische Behandlung der Lungen-
embolie; in Marx, R.: Thrombose und Embolie. F.K. Schattauer
Stuttgart 1970, p. 246
- 64) Witte, E.: Beziehungen der Fibrinolyse zum Gerinnungsme-
chanismus; in Hiemeyer, V.: Therap. und exp. Fibrinolyse.
F.K. Schattauer Stuttgart 1970, pp. 64-74

Lebenslauf

Ich, Heinz Bernhard Weber, wurde am 8. März 1950 als erstes von zwei Kindern des Zahnarztes Dr. Heinz Weber und seiner Ehefrau Anneliese, geborene Klemp, in Mittenwald geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich in Mittenwald die Volksschule, ab 1960 das humanistische Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen, wo ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Universität München das Medizinstudium, bestand im Oktober 1970 das Vorphysikum und im April 1972 das Physikum.

Im Wintersemester 1972/73 nahm ich das Doppelstudium Allgemeinmedizin und Zahnmedizin auf. Im September 1973 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung und beabsichtige 1976 das zahnmedizinische Staatsexamen abzulegen.

